

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

---

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 657 879

②1 N° d'enr gistrem nt national :

90 01234

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 M 3/06

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 02.02.90.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 09.08.91 Bulletin 91/32.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : IMEDEX société anonyme — FR.

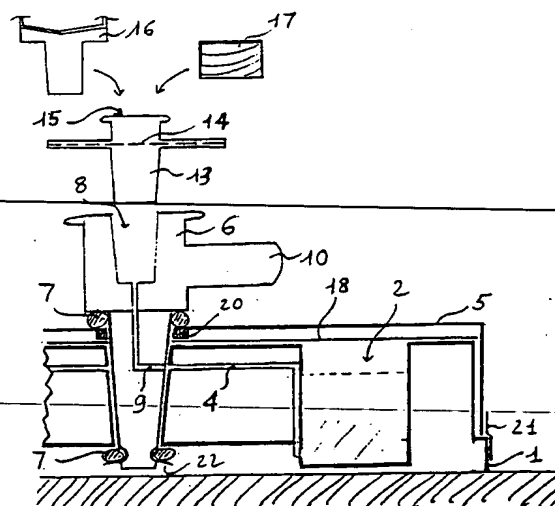
⑦2 Inventeur(s) : Pouradier-Duteil Xavier Marie.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Lemoine et Bernasconi.

⑤4 Plaque de culture cellulaire.

⑤7 La plaque de culture cellulaire comporte une pluralité de puits de culture (2) ouverts à leur sommet et destinés à êtreensemencés dans des conditions stériles, ainsi que des moyens (18) pour rendre les puits (2) étanches aux liquides et pour filtrer stérilement l'air ou les gaz entrant dans les, ou sortant des, puits (2) et des moyens (6, 9, 13) pour assurer une circulation stérile de liquide vers les, ou à partir des, puits (2).



FR 2 657 879 - A1



### Plaque de culture cellulaire.

L'invention concerne une plaque de culture cellulaire comportant une pluralité de puits de culture  
5 destinés à êtreensemencés dans des conditions stériles.

La culture de cellules animales ou végétales in vitro se pratique d'ordinaire dans des flacons à fond plat, dans des flacons appelés "rollers" ou dans les puits de plaques dites multipuits en polystyrène, sur des billes en  
10 suspension dans le milieu de culture, dans un faisceau de fibres creuses ou directement en suspension dans le milieu de culture.

Le matériel utilisé doit être stérile et les interventions au cours de la culture doivent se faire dans  
15 des conditions stériles nécessitant un savoir-faire et une infrastructure spécialisée : hotte à flux laminaire ou zone

stérile, matériel stérile, jetable ou stérilisable (pipettes, filtres stérilisants, flacons de milieu, flacons ou microplaques de culture) et étuve.

A l'heure actuelle, aucun dispositif connu ne rend  
5 la culture cellulaire in vitro facilement praticable par des non-spécialistes tels que les pharmacologistes, les chimistes, les biochimistes, les bactériologistes intéressés notamment par l'étude de l'effet de différents produits qu'ils utilisent sur des cellules animales ou  
10 végétales en culture.

La présente invention a donc pour objectif de fournir un dispositif de culture cellulaire simple d'utilisation et ne nécessitant pas une infrastructure spécialisée et, notamment, permettant à tous les  
15 utilisateurs potentiels de cultures cellulaires, qu'ils soient des spécialistes ou des non-spécialistes, d'étudier l'effet de produits à différentes dilutions sur des cellules vivantes sans recourir aux précautions habituelles de stérilité (hotte à flux laminaire et matériel stérile),  
20 à condition de travailler avec des cellules préalablementensemencées stérilement dans le dispositif de l'invention.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un tel dispositif qui soit peu onéreux.

L'invention a pour objet une plaque de culture  
25 ~~cellulaire comportant une pluralité de puits de culture~~  
ouverts à leur sommet et destinés à êtreensemencés dans des conditions stériles, caractérisée en ce qu'elle comporte des moyens pour rendre les puits étanches aux

liquides et pour filtrer stérilement l'air ou les gaz entrant dans les, ou sortant des, puits et des moyens pour assurer une circulation stérile de liquide vers les, ou à partir des, puits.

5 De préférence, la plaque selon l'invention comporte une vanne agencée de manière à pouvoir mettre les puits, simultanément ou individuellement, en communication avec l'entrée de la vanne, ladite entrée étant munie d'un dispositif de filtration stérilisante, et l'ouverture des  
10 puits est protégée contre les micro-organismes. De préférence, les puits sont protégés séparément les uns des autres.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, les puits sont protégés par une matière  
15 hydrophobe, microporeuse et ne laissant pas passer les micro-organismes. Une telle matière autorise des échanges gazeux stériles entre les puits et le milieu extérieur, tout en étant imperméable aux liquides.

De préférence, les puits sont disposés de façon  
20 rayonnante et sont munis chacun d'un canal d'alimentation. On peut, par exemple, prévoir des plaques comportant une ou plusieurs séries de puits disposés en cercles concentriques. Toute disposition rayonnante peut bien sûr être envisagée. Cela permet l'utilisation d'une vanne  
25 centrale commune.

Dans un premier mode de réalisation, la vanne comporte un canal de sortie agencé de manière à pouvoir être mis en communication avec un canal d'alimentation de

l'un des puits. Cette vanne permet d'accéder au choix à chacun des puits individuellement.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, la vanne comporte des canaux de sortie en nombre correspondant au nombre de puits, les canaux de sortie étant agencés de façon rayonnante de manière à pouvoir mettre simultanément tous les puits en communication avec l'entrée de la vanne, par l'intermédiaire des canaux d'alimentation des puits. Cette vanne permet d'accéder simultanément à tous les puits de la plaque. Dans ce mode de réalisation, la plaque peut comporter, en outre, un canal de sortie décalé angulairement par rapport aux autres canaux de sortie et agencé de manière à pouvoir être mis en communication au choix avec l'un des canaux d'alimentation. Une telle vanne permet de bénéficier des possibilités de ces deux modes de réalisation.

De préférence, la vanne est placée de façon étanche dans une cavité située au centre de la plaque et à partir de laquelle rayonnent les canaux d'alimentation des puits. La vanne peut s'adapter dans la cavité par un rodage et il peut être prévu des joints toriques d'étanchéité. La vanne peut également s'adapter de toute autre manière dans la cavité, par exemple par un ajustement de surface étroit. Un moyen de serrage tel qu'un clip de serrage peut contribuer au maintien de la vanne dans ladite cavité. De préférence, la vanne comporte un repère de positionnement du ou des canaux de sortie par rapport aux canaux d'alimentation des

puits.

En amont du dispositif de filtration stérilisante, on prévoit avantageusement une embouchure sur laquelle on peut adapter un moyen d'injection ou d'aspiration de  
5 liquide, tel qu'une seringue.

On prévoit, de préférence, un couvercle venant recouvrir l'ouverture des puits à distance. Ce couvercle permet de protéger les puits de culture notamment lors du transport de la plaque et d'autre part, par l'utilisation  
10 de moyens rendant hermétique l'assemblage du couvercle ainsi que l'embouchure du dispositif de filtration, de rendre le dispositif totalement hermétique aux gaz.

La matière obturant l'ouverture des puits peut être une couche de matière recouvrant l'ouverture des puits ou  
15 un joint de mousse adhérent à la fois autour de l'ouverture des puits et au couvercle. Cette matière peut être par exemple du polyéthylène hydrophobe de haute densité.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la plaque est faite en matière plastique transparente et la  
20 matière obturant les puits est elle-même transparente ou tout au moins translucide. Cela permet l'observation des cellules en culture, notamment à l'aide d'un microscope inversé, et la numération des cellules. Une telle plaque pourra être stérilisée aux rayons gamma et utilisée comme  
25 un dispositif jetable.

Il peut être en outre prévu un puits destiné à recueillir du liquide utilisé pour rincer le dispositif de filtration et le volume mort de la vanne.



La plaque selon l'invention permet notamment, dans une ambiance, avec du matériel et avec des produits non nécessairement stériles, les manipulations suivantes :

- injection de produits dans des puits de culture cellulaire (différentes dilutions, produits différents, etc.) ;
- changement de milieu ou rinçage des cellules ;
- incubation des cellules en étuve ;
- observation et numération des cellules.

10 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation non limitatifs et se référant au dessin annexé. Celui-ci montre :

- à la figure 1, une vue schématique en perspective et éclatée d'une plaque de culture cellulaire selon 15 l'invention ;

- à la figure 2, une vue partielle en coupe de la plaque de la figure 1, montrant la vanne de façon plus détaillée ;

- à la figure 3, une vue schématique en coupe selon 20 la ligne III-III de la figure 2 ;

- à la figure 4, une vue analogue à celle de la figure 3, à plus grande échelle, d'une vanne permettant la distribution simultanée ou individuelle ;

- aux figures 5 et 6, des vues partielles en coupe 25 de plaques selon l'invention.

La plaque de la figure 1 comprend une base 1 comportant huit puits de culture 2 disposés en cercle et une cavité centrale 3. Chaque puits 2 est relié à la cavité

centrale 3 par un canal d'alimentation 4 débouchant un peu au-dessus du fond des puits 2. La plaque de culture cellulaire comporte en outre un couvercle 5 venant recouvrir les puits 2 de façon non hermétique.

5 Une vanne 6 vient se placer de façon étanche dans la cavité centrale 3. La vanne 6 s'adapte dans ladite cavité 3 par un rodage et elle s'étend jusqu'à la partie inférieure de la base 1 et dépasse légèrement de celle-ci, comme on peut le voir à la figure 2. On peut parfaire l'étanchéité  
10 de l'ensemble en disposant des joints d'étanchéité toriques 7 de part et d'autre de la base 1. La vanne 6 comporte une entrée 8 et un canal de sortie 9 permettant d'accéder au choix à l'un des puits individuellement, lorsque ledit canal de sortie 9 est mis en communication avec le canal  
15 d'alimentation 4 dudit puits 2 (voir la figure 3). Le positionnement du canal de sortie 9 est indiqué par un repère de positionnement 10 solidaire de la vanne 6.

La figure 4 présente la distribution des canaux de sortie d'une vanne permettant d'accéder aux puits de façon  
20 simultanée ou individuelle. Cette vanne comporte des canaux de sortie 11 en nombre correspondant aux canaux d'alimentation 4 des puits de culture. Comme les canaux d'alimentation 4 des puits de culture, les canaux de sortie 11 rayonnent avec des angles de 45° entre canaux voisins.  
25 La vanne comporte en outre un canal de sortie 12 décalé angulairement par rapport aux canaux de sortie 11.

On se réfère maintenant aux figures 5 et 6 sur lesquelles on peut voir un puits de culture 2, une vanne 6

analogue à celle de la figure 1 et un couvercle 5. Sur son entrée, la vanne 6 est munie d'un dispositif de filtration stérilisante 13 comportant un filtre 0,22  $\mu$  (par exemple de type Millex (de Millipore) ou Minisart (de Sartorius)) désigné par le repère 14 et une embouchure 15 agencée de manière à pouvoir être reliée à un dispositif d'injection ou d'aspiration, du type seringue 16, ou à un bouchon 17.

L'ouverture supérieure des puits de culture est recouverte d'une matière hydrophobe, microporeuse et ne laissant pas passer les micro-organismes. Cette matière est par exemple du polyéthylène hydrophobe de haute densité. A la figure 5, il s'agit d'une couche fine 18 collée à la surface de la base 1, tandis qu'à la figure 6, il s'agit de joints microporeux 19 constitués d'une mousse adhérant à la fois autour de l'ouverture des puits à la surface de la base 1 et au couvercle 5. Au voisinage de la cavité centrale 3, on a également prévu un joint d'étanchéité 20 entre le couvercle 5, la base 1 et la vanne 6.

Dans le mode de réalisation représenté à la figure 6, on a en outre disposé, entre le couvercle 5 et la base 1, un joint de mousse annulaire 19' isolant l'ensemble des puits.

Si l'on souhaite supprimer les échanges gazeux entre les puits de culture et le milieu extérieur, on obture l'entrée 8 de la vanne 6 à l'aide du bouchon 17 et l'on rend étanche la jonction base 1-couvercle 5 à l'aide d'un ruban adhésif 21 (voir la figure 5).

Pour parfaire l'assemblage de la vanne 6 dans la

cavité centrale 3, on peut prévoir un moyen de serrage tel qu'un clip de serrage 22.

On va maintenant décrire brièvement l'utilisation de la plaque de culture cellulaire selon l'invention.

5 La plaque est à usage unique et a été stérilisée par exposition à des rayons gamma. Avant le montage de la plaque, on introduit stérilement dans les puits des cellules en suspension dans un milieu de culture. De préférence, les puits ne sont pas remplis entièrement, afin  
10 de conserver une phase gazeuse. On les remplit par exemple au 1/2 ou au 2/3. On peut également ensemençer les puits stérilement via la vanne 6, le dispositif de filtration 13 ayant été retiré. La couche microporeuse hydrofuge ou les joints de mousse microporeuse hydrofuge assurent  
15 l'étanchéité au milieu et la filtration stérile de l'air.

Une fois la plaque assemblée avec son filtre 13, les manipulations usuelles de changement de milieu, d'injection de doses de produits à étudier, de rinçage des puits, d'incubation, etc., peuvent être effectuées en ambiance non  
20 stérile. Seul le changement du filtre nécessite l'environnement protecteur d'une flamme.

On peut par exemple effectuer la culture avec du bicarbonate et du tampon Hépès, la vanne étant en position  
25 non communicante et un ruban adhésif imperméable aux gaz étanchéifiant la jonction base 1-couvercle 5.

On peut aussi envisager une incubation en atmosphère  $\text{CO}_2$  en positionnant la vanne en communication simultanée en retirant le ruban adhésif rendant hermétique la jonction

base-couvercle, de façon à permettre l'équilibrage de la pression partielle de CO<sub>2</sub>.

Il va de soi que les cellules en culture pourraient être immobilisées sur, ou dans, tout support usuel, tel que  
5 microbilles, fibres creuses, etc.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation décrits et représentés mais en englobe les variantes qui sont à la portée du spécialiste.

## REVENDECATIONS

1. Plaque de culture cellulaire comportant une pluralité de puits de culture (2) ouverts à leur sommet et destinés à être ensemencés dans des conditions stériles, caractérisée en ce qu'elle comporte des moyens (18 ; 19, 19') pour rendre les puits (2) étanches aux liquides et pour filtrer stérilement l'air ou les gaz entrant dans les, ou sortant des, puits (2) et des moyens (6, 9, 13) pour assurer une circulation stérile de liquide vers les, ou à partir des, puits (2).

2. Plaque selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte une vanne (6) agencée de manière à pouvoir mettre les puits (2), simultanément ou individuellement, en communication avec l'entrée (8) de la vanne (6), ladite entrée (8) étant munie d'un dispositif de filtration stérilisante (13), et en ce que l'ouverture des puits est protégée contre les micro-organismes.

3. Plaque selon la revendication 2, caractérisée en ce que les puits (2) sont protégés séparément les uns des autres.

4. Plaque selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les puits (2) sont protégés par une matière (18 ; 19, 19') hydrophobe, microporeuse et ne laissant pas passer les micro-organismes.

5. Plaque selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que les puits (2) sont disposés

de façon rayonnante et sont munis chacun d'un canal d'alimentation (4) et en ce que la vanne (6) comporte un canal de sortie (9) agencé de manière à pouvoir être mis en communication avec un canal d'alimentation (4) de l'un des  
5 puits (2).

6. Plaque selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que les puits (2) sont disposés de façon rayonnante et sont munis chacun d'un canal d'alimentation (4) et en ce que la vanne (6) comporte des  
10 canaux de sortie (11) en nombre correspondant au nombre de puits (2), les canaux de sortie (11) étant agencés de façon rayonnante de manière à pouvoir mettre simultanément tous les puits (2) en communication avec l'entrée (8) de la vanne (6), par l'intermédiaire des canaux d'alimentation  
15 (4) des puits (2).

7. Plaque selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre un canal de sortie (12) décalé angulairement par rapport aux autres canaux de sortie (11) et agencé de manière à pouvoir être mis en communication au  
20 choix avec l'un des canaux d'alimentation (4).

8. Plaque selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que la vanne (6) est placée de façon étanche dans une cavité (3) située au centre de la plaque et à partir de laquelle rayonnent les canaux  
25 d'alimentation (4) des puits (2).

9. Plaque selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que la vanne (6) comporte un repère de positionnement (10) du ou des canaux de sortie (9 ; 11, 12)

par rapport aux canaux d'alimentation (4) des puits (2).

10. Plaque selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que, en amont du dispositif de filtration stérilisante (13), il est prévu une embouchure  
5 (15) sur laquelle on peut adapter un moyen d'injection ou d'aspiration de liquide, tel qu'une seringue (16).

11. Plaque selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'il est prévu un couvercle (5) venant recouvrir l'ouverture des puits (2) à distance.

10 12. Plaque selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il est prévu des moyens (21, 17) pour rendre hermétique l'assemblage du couvercle (5) et l'embouchure (15).

13. Plaque selon la revendication 2, caractérisée en ce que la matière obturant l'ouverture des puits (2) est  
15 une couche de matière (18) recouvrant l'ouverture des puits.

14. Plaque selon l'ensemble des revendications 2 et 11, caractérisée en ce que la matière obturant l'ouverture des puits est un joint de mousse (19) adhérent autour de  
20 l'ouverture des puits (2) et au couvercle (5).

15. Plaque selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle est faite en matière plastique transparente et en ce que la matière obturant les puits est transparente ou translucide.

25 16. Plaque selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'il est prévu un puits destiné à recueillir du liquide utilisé pour rincer le dispositif de



14

filtration et le volume mort de la vanne.

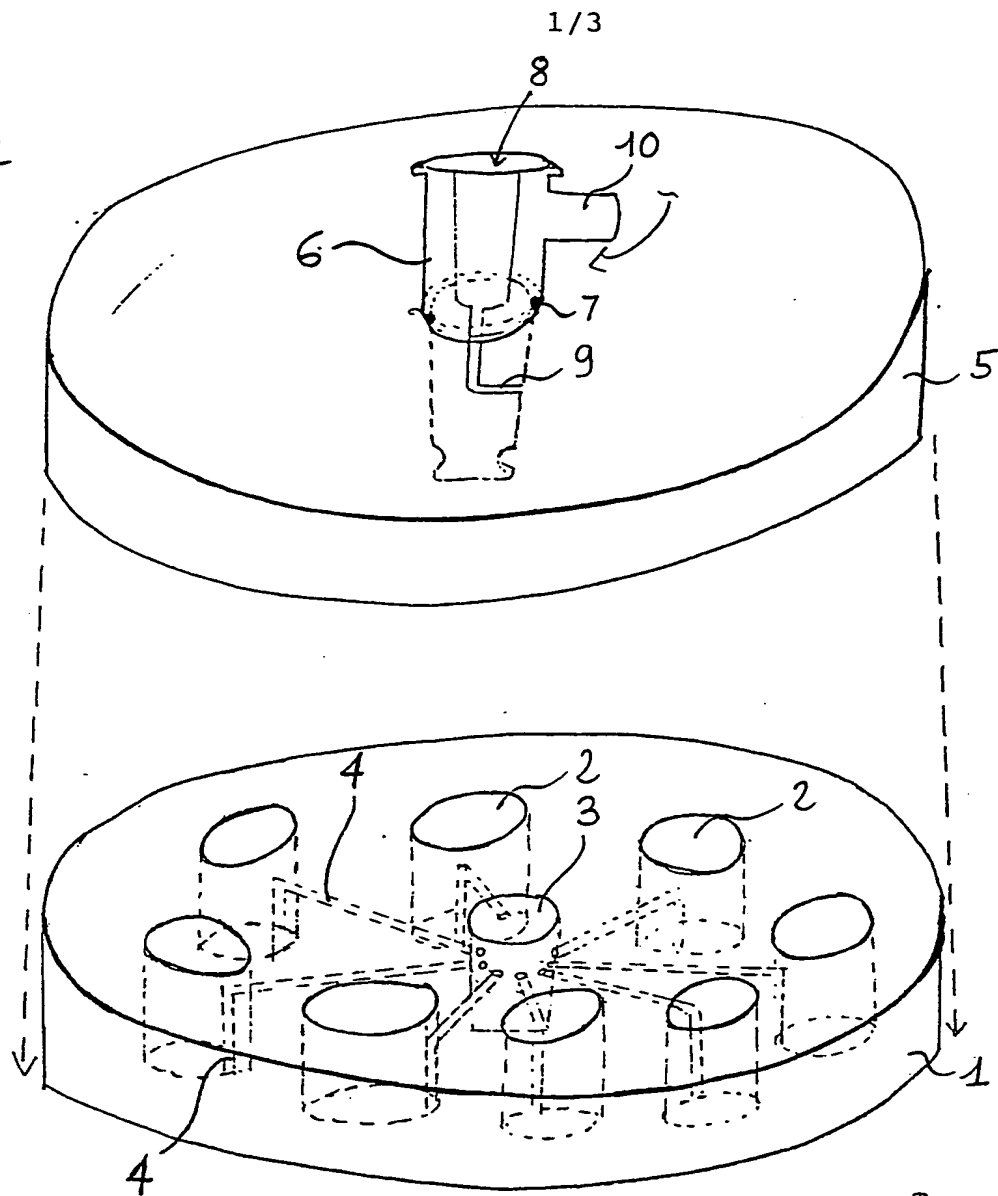
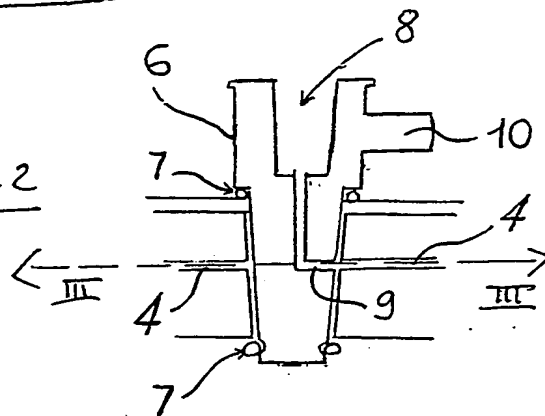
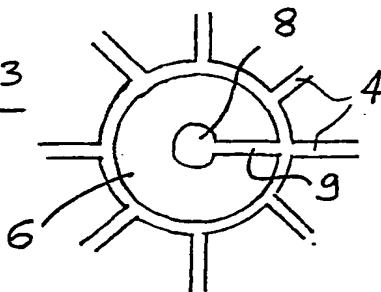
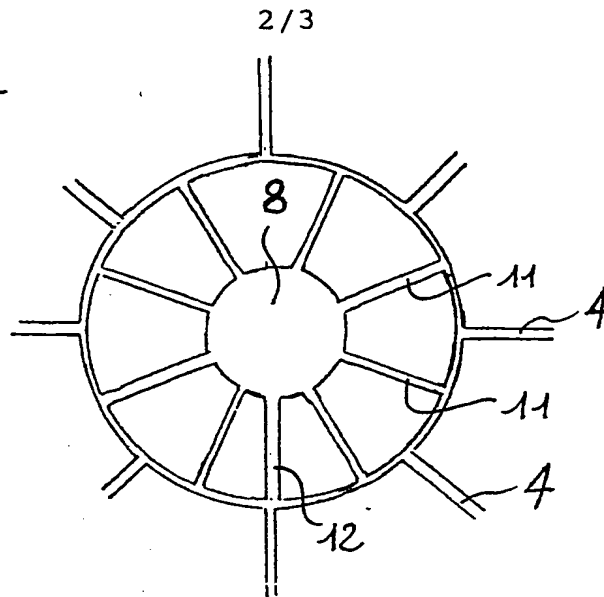
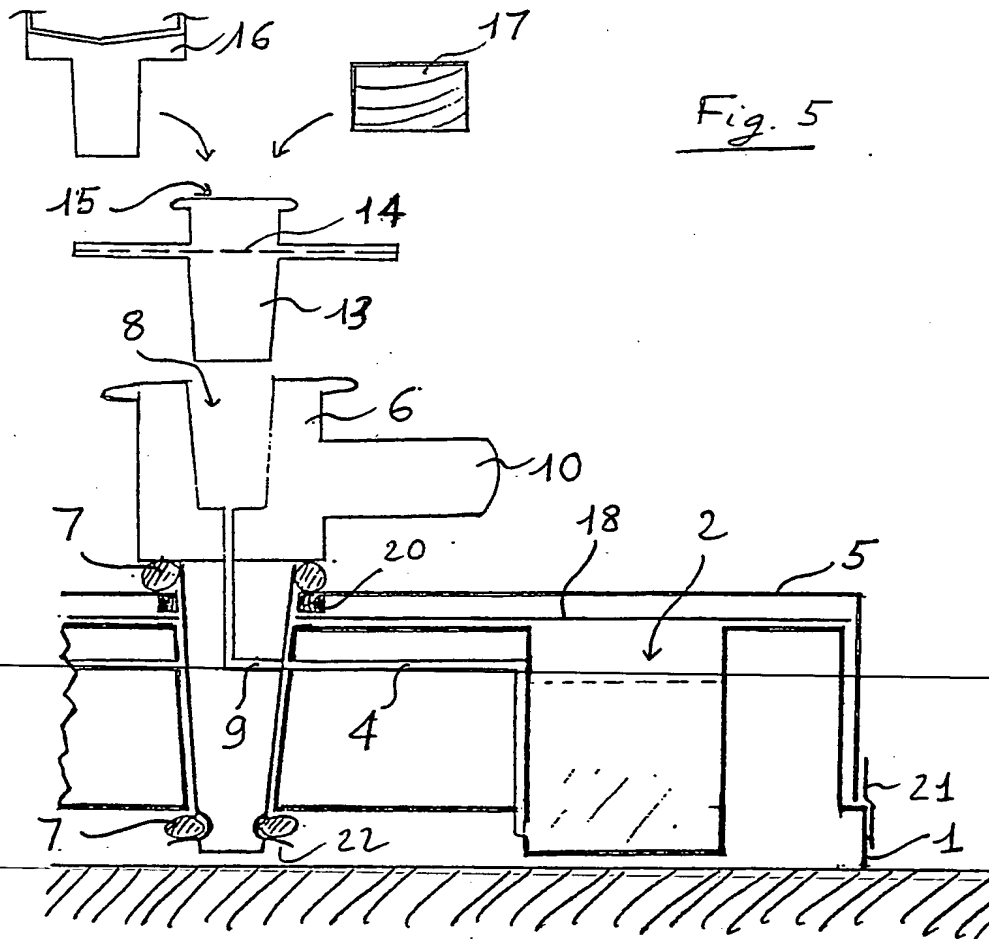
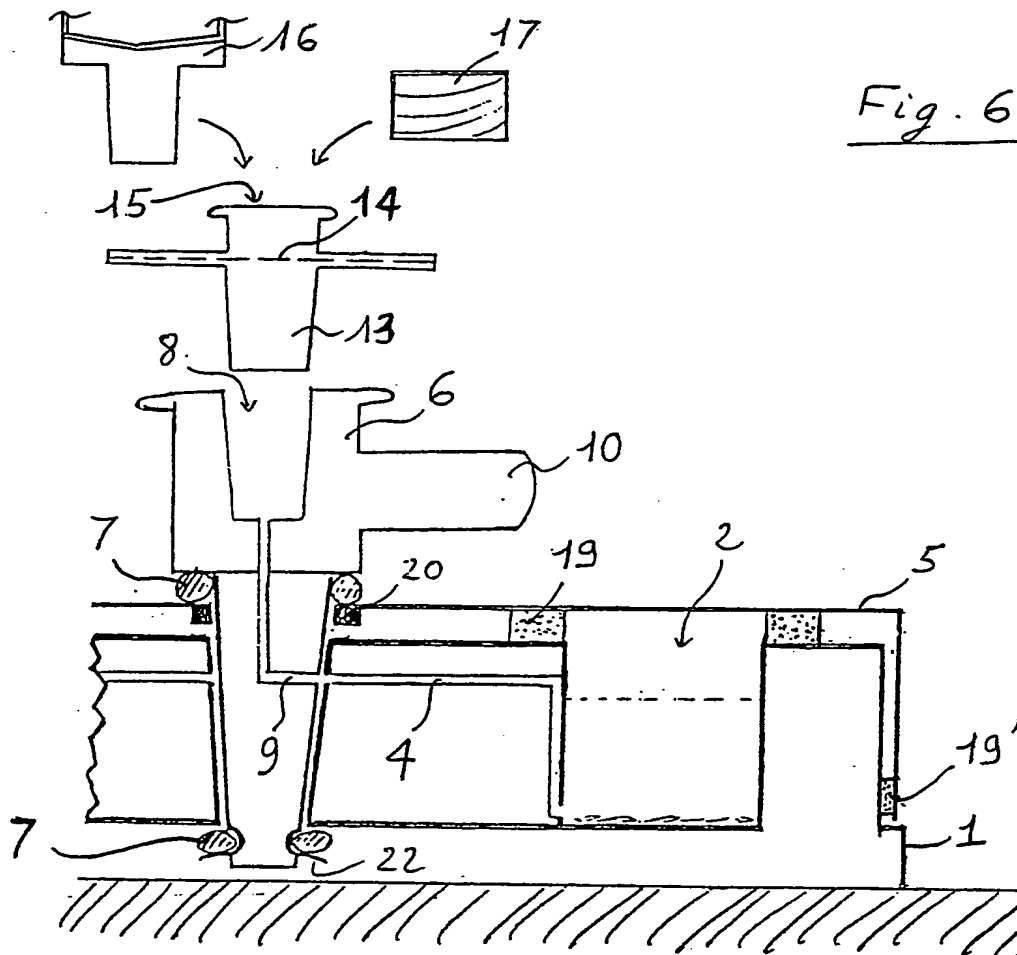
Fig. 1Fig. 2Fig. 3

Fig. 4Fig. 5



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9001234  
FA 437205

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	FR-A-2 280 895 (INTERTECHNIQUE) * Revendications 1-13; page 4, ligne 23 - page 6, ligne 29; page 7, lignes 2-4; fig. *	1-3,6,8 ,11-13, 15
X	FR-A-2 440 400 (H.E. MEUNIER) * Revendications 1-28; fig.; page 7, lignes 9-35 *	1-3,6,8 ,15
A		10,11, 12
A	FR-A-2 354 554 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORP.)	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 12 M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13-09-1990		COUGKE-A.O.M.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**